



*Sveriges lantbruksuniversitet*

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

# Förekomst och karaktärisering av *Clostridium difficile* från friska hundar

Karl-Johan Wetterwik

*Uppsala*

*2011*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2011:8*



Förekomst och karaktärisering av *Clostridium difficile*  
från friska hundar

Karl-Johan Wetterwik

*Handledare: Karel Krovacek,  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap  
Biträdande handledare: Gunilla Trowald-Wigh,  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Examinator: Sofia Boqvist,  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap  
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: Clostridium difficile, hundar, faeces*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2011:8*

## TACK

Karel Krovacek, handledare, för att du tidigt väckte mitt intresse för bakteriologi, och för allt det stöd, inspiration och den utomordentliga handledning jag fått under detta arbete. Tack också för många intressanta och trevliga pratstunder om vetenskap, politik, historia och familjeliv som jag alltid kommer att minnas med stor glädje.

Gunilla Trowald-Wigh, biträdande handledare, för trygg och fast handledning i det vetenskapliga skrivandets konst. Tack också för din vänlighet, tålamod och stora engagemang.

Lise-Lotte Fernström. Föreståndare för laboratoriet. Min bästa vän i labbet som har hjälpt mig med allt det praktiska utan att tröttna det minsta.

Gun Larsson, djursjukskötare vid universitetsdjursjukhuset. Stort tack för hjälpen med insamling av prover.

Olov Carlsson, biomedicinsk analytiker. Tack för all hjälp och problemlösning i labbet.

Karl-Erik Johansson, professor inom bakteriologi och livsmedelssäkerhet, SLU. Stort tack för all hjälp med sekvensering och fylogenetik.

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	1
Inledning .....	2
Litteraturoversikt .....	3
<i>Clostridium</i> species .....	3
<i>Clostridium difficile</i> .....	3
Historik .....	3
Morfologi & Egenskaper .....	4
Habitat .....	5
Sporer .....	6
Epidemiologi .....	7
Patogenes .....	8
Patogenicitet .....	9
Virulensfaktorer .....	9
Toxiner .....	10
Adhesiva egenskaper .....	11
Kapsel .....	11
Kemotaxis och motilitet .....	11
Exoenzymer .....	12
Sjukdomsbild hos djur .....	12
Sjukdomsbild hos människor .....	13
Diagnostik/Identifiering .....	14
Behandling och prevention av CDI hos människor .....	15
Förekomst och karaktärisering av <i>Clostridium difficile</i> från friska hundar .....	17
Syfte .....	17
Material och metoder .....	17
Provtagningsmaterial och provtagningsmetodik .....	17
Odling .....	17
Identifiering .....	18
L- prolin aminopeptidastest .....	18
Latex agglutinationstest .....	19
Sekvensering .....	19
Toxinproduktion .....	20
Antibiotikaresistensbestämning .....	22
Resultat .....	23
Diskussion .....	25
Litteraturförteckning .....	29

## Förkortningar

AAD	Antibiotic associated diarrhoea
CDI	<i>Clostridium difficile</i> infection
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> associated diarrhoea
PMC	Pseudomembranous colitis
Vero	Cellinje från grön markatta (green monkey)
PBS	Phosphate buffered saline
BHI	Brain heart infusion
tcdA	Gen kodande för <i>Clostridium difficile</i> toxin A
tcdB	Gen kodande för <i>Clostridium difficile</i> toxin B
FAA	Fastidious anaerobe agar

## SAMMANFATTNING

*Clostridium difficile* är en anaerob, grampositiv sporbildande bakterie som tillhör släktet *Clostridium*. Under 1970- talet rapporterades att vissa stammar av *C. difficile* hade förmåga att producera potenta enterotoxiner (toxin A) och cytotoxiner (toxin B). Dessa studier kopplade också samman antibiotika-behandling med tillväxt av *C. difficile* och pseudomembranös colit (PMC) hos människa. Idag är *C. difficile* den vanligaste orsaken till nosokomial tarmsmitta hos människor. *Clostridium difficile* har också isolerats från olika djurslag och kan orsaka antibiotikaassocierad diarré (AAD) hos häst.

I denna studie har förekomst av *C. difficile* i faeces från 50 friska hundar undersökts. Toxinproduktion och antibiotikaresistens hos isolerade stammar har också studerats. *Clostridium difficile* isolerades från två (4%) av de 50 undersökta hundarna. Inget av isolaten producerade toxin A eller B. Ett av isolaten var resistent mot metronidazol.

Vid sekvensering av misstänkta *C. difficile* isolat identifierades även andra ovanliga klostridiearter såsom *Clostridium hiranonis*, *Clostridium glycolicum* och *Clostridium paraputrificum*.

Resultaten från denna studie visar på låg förekomst av icke- toxigena *C. difficile* hos denna grupp friska hundar. Fynd av metronidazolresistenta *C. difficile* isolat är mycket ovanligt och är särskilt intressant med tanke på den utbredda användningen av detta antibiotikum till hundar. För fortsatta studier kring *C. difficile* skulle det vara intressant att undersöka förekomst och toxinproduktion hos hundar med diarré, och hos hundar som behandlats med antibiotika.

## SUMMARY

*Clostridium difficile* is an anaerobe, grampositive sporeforming species of the genus *Clostridium*. In the seventies, it was reported that *C. difficile* is capable of producing potent enterotoxins (toxin A), and cytotoxins (toxin B). These studies also described the link between the use of antibiotics, colonization by *C. difficile* and occurrence of pseudomembranous colitis (PMC) in man. Today, *C. difficile* is the most frequent cause of nosocomial gastrointestinal infections in humans. The bacterium has also been isolated from different animal species and causes antibiotic associated diarrhoea (AAD) in horses.

In this study, faeces from 50 healthy dogs were investigated for the presence of *C. difficile*. Toxin production and antibiotic resistance pattern of the isolates were also studied. *Clostridium difficile* was isolated from two (4%) of the 50 dogs. None of the isolates produced toxin A or B. One of the isolates was resistant to metronidazole.

Other unusual *Clostridium* species such as *Clostridium hiranonis*, *Clostridium glycolicum* and *Clostridium paraputrificum* were identified while sequencing presumptive *C. difficile* isolates.

The results of this study indicates a low occurrence of non- toxigenic *C. difficile* strains in this group of healthy dogs. Metronidazole resistant *C. difficile* isolates are rarely reported, but are of special interest since metronidazol is a frequent used antibiotic for treatment of dogs. This warrants more comprehensive studies of the occurrence of *C. difficile* also among dogs with diarrhoea and dogs treated with antibiotics.

## INLEDNING

Genus *Clostridium* omfattar över 100 arter. Klostridier är anaeroba till aerotoleranta stora grampositiva stavar. Samtliga arter bildar endosporer och en majoritet av dem är rörliga med hjälp av flageller. Totalt räknas knappt 20 arter som patogena och flertalet av dessa får sin virulensförmåga genom att producera exotoxiner. *Clostridium* species orsakar hos djur och människor flera allvarliga sjukdomar (Quinn *et al.* 2002).

*Clostridium difficile* är en viktig nosokomial patogen som ger upphov till olika typer av tarminfektioner hos människor, från den mildare formen *C. difficile* associerad diarré (CDAD) till den svårare formen pseudomembranös colit (PMC) (Barbut & Petit, 2001). *Clostridium difficile* kan också orsaka tarminfektioner hos djur (Båverud *et al.* 1997; Songer & Andersson, 2006).

*Clostridium difficile* infektioner (CDI) förknippas i stor utsträckning med användningen av antibiotika, vilket anges som den främsta riskfaktorn (Barbut & Petit, 2001). Antibiotikaterapi anses vara ett avgörande steg i patogenesen, eftersom en rubbning av tarmfloran möjliggör för *C. difficile* att kolonisera tarmen (Borriello, 1998). *Clostridium difficile* kan i detta sammanhang också dra fördel av sin resistens mot olika antibiotika (Gerding, 2004). Huvudsakliga virulensfaktorer hos *C. difficile* utgörs av toxin A som är ett enterotoxin och toxin B som är ett cytotoxin (Borriello, 1998). De båda toxinerna tros även utöva en synergistisk verkan (Lyerly *et al.* 1985).

*Clostridium difficile* har isolerats från olika djurslag, däribland häst, hund, kalv och svin (Keel *et al.* 2007). Den kan även isoleras från omgivningen och symtomlösa personer (Rupnik, 2010).

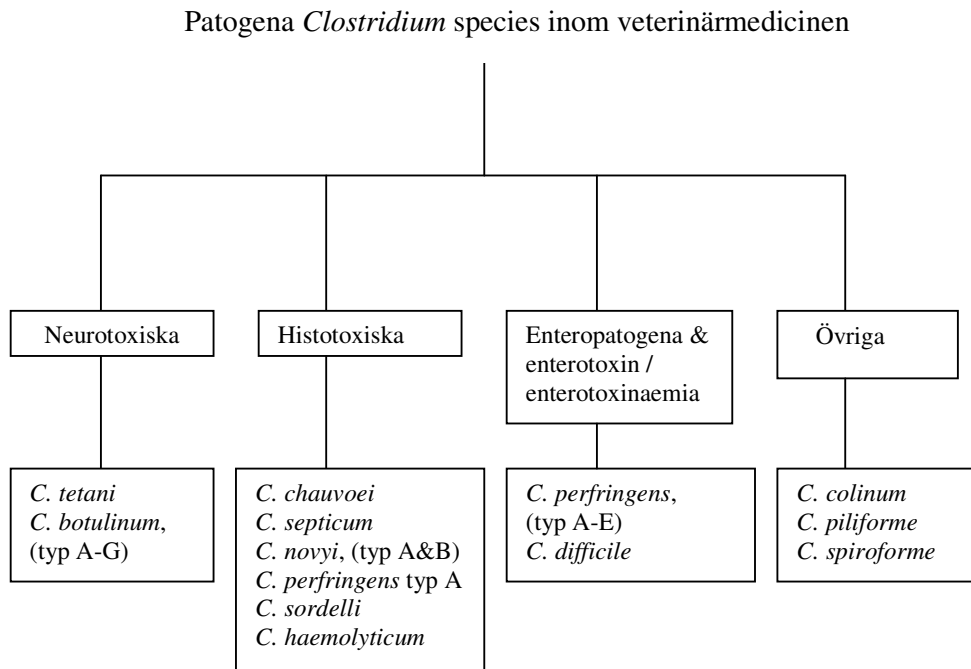
Antalet *C. difficile* infektioner hos människor har ökat i de industrialiserade länderna sedan 1990- talet trots försök till motåtgärder (DuPont & Garey, 2010). De senaste åren har även flera studier rapporterat om fynd av *C. difficile* i köttprodukter (Gould & Limbago, 2010). Med anledning av att samma ribotyper har isolerats från både sjuka människor och djur har det diskuterats om bakterien kan ha en zoonotisk potential och om husdjur kan utgöra en reservoar för smittan (Gould & Limbago, 2010).

Flera utländska studier beskriver förekomst av *C. difficile* hos hundar (Borriello, 1983; Cave *et al.* 2002; Zerbini & Ossiprandi, 2007; Struble *et al.* 1994; Weese *et al.* 2010). Den här pilotstudien syftar till att studera förekomst av *C. difficile* i faeces från friska hundar i Sverige samt karaktärisering av isolat. Ingen liknande undersökning på hundar har till min kännedom publicerats tidigare i Sverige eller våra grannländer.



## LITTERATURÖVERSIKT

### *Clostridium* species



*Modifierad från Quinn et al. 2002*

### *Clostridium difficile*

#### Historik

*Clostridium difficile* isolerades första gången 1935 från avföringen hos en grupp friska nyfödda barn (Hall & O'Toole, 1935). Hall & O'Toole hade svårigheter att odla bakterien och gav den därför namnet "*Bacillus difficilis*". Ytterligare studier visade att den producerade ett potent toxin med dödlig effekt på marsvin. Bakterien klassificerades senare om och gavs namnet *Clostridium difficile* tillhörande släktet *Clostridium* inom familjen *Clostridiaceae*.

Efter Hall & O'Tooles upptäckt och inledande arbete följde en längre period då intresset för bakterien efterhand avtog. Även om den toxiska effekten gick att upprepa i försök på olika djurslag hade man svårt att finna belägg för att bakterien kunde orsaka klinisk sjukdom hos människa. Bakteriens förmåga att producera toxin *in vivo* blev också ifrågasatt (Smith & King, 1962).

Under andra världskriget gjordes en upptäckt som långt senare bidrog till förståelsen för *C. difficile* som en patogen mikroorganism (Bartlett, 2009). I samband med gasgangrän som en vanlig konsekvens av sårskador prövades antibiotikabehandling. Som försöksmodell användes marsvin som behandlades med penicillin. Forskarna blev överraskade av att så många av marsvinen därefter avled i en svårartad blodig tarmsjukdom (Hambre *et al.* 1943). Orsaken till tarmsjukdomen kunde inte fastställas närmare, men man förstod då att penicillin kunde vara dödligt för gnagare.

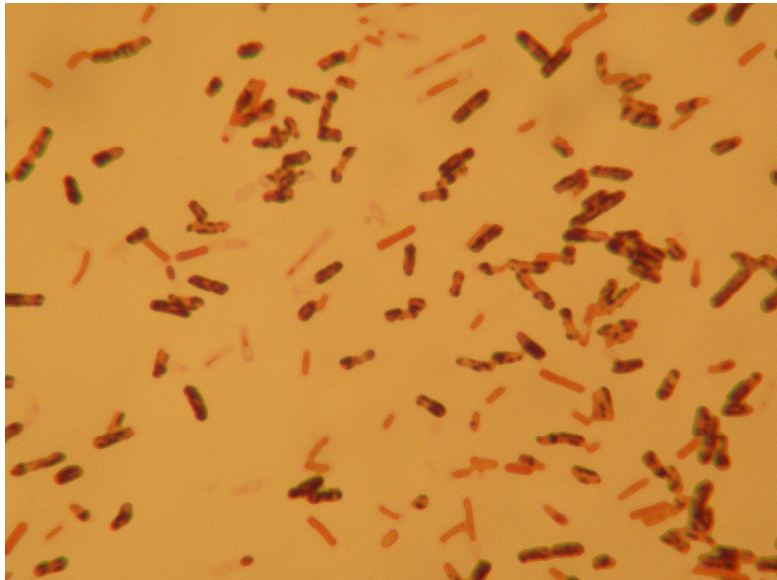
På 1970- talet i USA var klindamycin "the drug of choice" för behandling av anaeroba infektioner (Bartlett, 2009). Läkaren och gastroenterologen F. J. Tedesco, reagerade på att flera av hans patienter som behandlats med klindamycin drabbades av mycket svår diarré. Tedesco ledde sedan en studie där man kunde visa på extraordinära resultat. Av 200 patienter som behandlats med klindamycin fick 21% antibiotikaassocierad diarré och 10% utvecklade den svårare formen, pseudomembranös colit (PMC) (Tedesco *et al.* 1974). Efter detta benämndes PMC synonymt med "Clindamycin-colitis" (Bartlett, 2009). Detta bidrog till att flera forskargrupper nu arbetade intensivt på att finna den bakomliggande orsaken.

Bartlett *et al.* (1977a), visade i försök att vancomycin kunde utgöra skydd mot AAD när det gavs till hamstrar efter en "challenge" med klindamycin. Efterhand förstod man att en bakteriell grampositiv patogen kunde vara orsaken (Bartlett, 2009). Kort därefter, i en serie djurförsök på hamstrar påvisades sjukdomsframkallande egenskaper hos en sådan mikroorganism. Bakterien visade sig vara *Clostridium difficile*. (Bartlett *et al.* 1977b; Chang *et al.* 1978). De följande åren blev även toxinerna (toxin A och B) mer utförligt beskrivna och den cytotoxiska effekten kunde studeras *in vitro*. Under perioden 1979 till 1981 skrev Chang *et al.* (1979;1981) och Taylor *et al.* (1979;1981) en serie viktiga och klarläggande artiklar inom detta område.

### Morfologi & Egenskaper

*Clostridium difficile* är en grampositiv sporbildande obligat anaerob stav. De flesta stammar är motila (Delmée *et al.* 1990). Efter anaerob inkubering på blodagar i 48 timmar vid 37°C framträder stora gråa kolonier (2- 5mm) med en oregelbunden kant, utan hemolys.

I renkultur kan man känna en karakteristisk lukt som påminner om stallukt från agarplattan. Kolonierna fluorescerar svagt i UV-ljus. Vid gramfärgning ses stora grampositiva till gramvariabla stavar med subterminala sporer. (Vetbakt, SLU, 2010; Wolfhagen *et al.* 1994).



*Gramfärgning. Foto: K-J Wetterwik*



*Kolonimorfologi på selektivagar. Foto: K-J Wetterwik*

### **Habitat**

Även om *C. difficile* infektion först och främst är en nosokomial infektion som huvudsakligen förknippats med människor eller hästar i sjukhusmiljö, är det känt att bakterien är spridd i omgivningen. Bakterien isolerades första gången från avföringen hos spädbarn. Senare studier har funnit att denna bakterie är vanligt förekommande hos små barn, sannolikt p.g.a. de ännu inte etablerat sin tarmflora.

Spädbarn tycks även vara okänsliga för *C. difficile* toxiner (Jangi & Lamont, 2010). Hos vuxna anses inte *C. difficile* tillhöra den normala tarmfloran, men det är känt att cirka 3%- 5% kan vara asymtomatiska bärare (Gould & Limbago, 2010).

Ett fåtal studier beskriver förekomsten av *C. difficile* i omgivningen från olika världsdelar (Hafiz, 1974; Al Saif & Brazier, 1996; Simango 2006).

I en undersökning från England, Al Saif & Brazier, (1996), isolerades *C. difficile* i varierande omfattning från hundar, katter, hem- miljö, grönsaker, flodvatten, havsvatten och jord. Studien visade att det finns ett antal olika vägar som människor och djur kan bli exponerade för denna bakterie. Dessa författare rapporterade också att faecesprover från livsmedelsproducerande djur (nöt, svin, får och fisk) hade en låg prevalens eller var helt negativa för *C. difficile*. Andra undersökningar rapporterar att *C. difficile* är en mycket vanligt förekommande omgivningsbakterie på både humansjukhus och djursjukhus. Sjukhusmiljö utgör därmed en viktig reservoar för *C. difficile* (Al Saif & Brazier, 1996; Weese *et al.* 2000; Barbut & Petit, 2001).

Studier från USA, Kanada och Italien rapporterar om hög förekomst (20%- 55%) av *C. difficile* hos friska hundar, medan andra undersökningar visat på betydligt lägre förekomst ( $\leq 10\%$ ) (Borriello, 1983; Cave *et al.* 2002; Zerbini & Ossiprandi, 2007; Struble *et al.* 1994; Weese *et al.* 2010). Det är värt att notera att toxinproducerande såväl som icke toxinproducerande stammar av *C. difficile* har isolerats från både friska hundar och hundar med diarré (Zerbini & Ossiprandi, 2007).

Med anledning av fynden hos sällskapsdjuren och det faktum att identiska virulenta stammar (ribotyper), återfinns hos människor och djur har det diskuterats om djuren kan utgöra en reservoar för smittan (Borriello, 1983; Gould & Limbago, 2010). Under senare delen av 2000- talet har förekomst av *C. difficile* i köttprodukter rapporterats i ett antal artiklar både från Nordamerika och Europa. Det har visat sig att förekomsten av *C. difficile* i köttprodukter var hög eller mycket hög (upp till 50%) i USA och Kanada medan liknande studier från Europa visar på en betydligt lägre förekomst ( $< 5\%$ ) (Indra, 2009; Von Abercron, 2009; Gould & Limbago, 2010; Jöbstl, 2010).

Det är oklart hur överföringen av smitta sker ute i samhället. Fynden bland våra husdjur, i köttprodukter och vatten m.m. indikerar att det finns ett antal tänkbara reservoarer som kan vara betydelsefulla ur ett epidemiologiskt perspektiv (Gould & Limbago, 2010).

## **Sporer**

Bildandet av endosporer har en avgörande betydelse för spridningen av *C. difficile*- infektioner (Burns *et al.* 2010). Sporererna är motståndskraftiga mot värme, strålning, kemikalier och antibiotika (Sorg & Sonenshein, 2008). För att kunna orsaka sjukdom måste dock sporererna germinera (gro) och återvända till en vegetativ cellväxt. Förståelse för mekanismerna bakom aktivering och grodd av sporer kan bli viktigt för att ta fram effektiva rengöringsmetoder, hantera

sjukdomsutbrott och för att om möjligt finna nya läkemedel. Hos *Bacillus* species är mekanismer kring sporbildning relativt välstuderade, medan för *C. difficile* har tills nyligen kunskapsunderlaget varit av ringa omfattning. Studier avseende *Bacillus subtilis*- sporer har visat att det finns receptorer i dess membran som reagerar med olika aktuatorer i den omgivande miljön, t.ex. aminosyror, glukos och olika joner. I en gynnsam miljö groer därför sporen och förvandlas till en vegetativ cell. *Clostridium difficile* är inte lika välstuderad, men arbete pågår i olika forskargrupper där man försöker identifiera receptorer för sporaktivering genom genetisk kartläggning. Förhoppningsvis kommer resultat av sådan forskning att leda till en bättre förståelse för vilken kombination av miljöfaktorer som får en *C. difficile*- spor att germinera (Burns *et al.* 2010).

Nyligen har några intressanta studier visat hur gallsyror kan påverka germinering av *C. difficile*. Sorg & Sonenshein (2008), har visat att den primära gallsyran cholat och dess olika derivat i kombination med glycin har en stimulerande effekt på germinering av *C. difficile*- sporer. I kontrast till cholat fann man att den sekundära gallsyran deoxycholat förhindrade vegetativ växt av *C. difficile*. Deoxycholat bildas i grovtarmen från primära gallsyror genom påverkan (biotransformation) från vissa bakteriearter ur genus *Clostridium*. *Clostridium scindens* och *Clostridium hiranonis* har rapporterats som effektiva omvandlare av primär till sekundär gallsyra (Kitahara *et al.* 2001; 2004; Wells *et al.* 2003). I ytterligare en studie (Sorg & Sonenshein, 2009) visades även att en annan primär gallsyra, chenodeoxycholat hade en inhiberande effekt på germinering.

Dessa gallsyror betydelse för *C. difficile* är förenlig med tidigare kunskap om gallsyran taurocholat, som har en gynnsam effekt vid anrikning och odling av *C. difficile* (Wilson *et al.* 1982). Sorg & Sonenshein har diskuterat interaktionen mellan *C. difficile* och olika former av gallsyror. Kan variationer mellan olika individers nivåer av gallsyror i tarmen vara en förklaring till skillnaden i infektionskänsligheten mellan olika individer? Kan gallsyror vara en del i patogenesen för CDI ?

## **Epidemiologi**

Infektion med *C. difficile* anses idag vara den ledande orsaken till sjukhusrelaterad diarré och orsakar årligen många sjukdomsfall i Nordamerika och Europa (MacFarland *et al.* 2007; Voth & Ballard, 2005). Under 2000- talet har det epidemiologiska mönstret delvis förändrats. På sjukhusen har smittan börjat orsaka regelrätta utbrott med förhöjd morbiditet och mortalitet bland patienter. Utbrotten sätts delvis i samband med uppdykandet av en hypervirulent stam (ribotyp 027) som utmärker sig genom en ökad toxinproduktion och resistens mot fluorokinoloner. Dessutom förknippas ribotyp 027 med hyperproduktion av sporer (MacFarland *et al.* 2007). Ytterligare en *C. difficile* stam (ribotyp 078) har under de senare åren kopplats till sjukdomsfall hos människa. Denna ribotyp förknippas också med hypervirulens och proportionen av CDI med denna ribotyp har ökat i Holland och Storbritannien sedan 2006 (Barbut *et al.* 2007; Goorhuis *et al.* 2008; Hensgens *et al.* 2009).

Det är välkänt att de främsta riskfaktorerna för att utveckla CDAD är: antibiotikaterapi, ålder > 65 och vård på sjukhusavdelningar med intensivvård (Barbut & Petit, 2001).

CDI har tidigare ansetts som en uteslutande nosokomial infektion, men enligt rapporter från Kanada, USA och Frankrike förekommer sjukdomen nu även till viss del ute i samhället. Det har också uppmärksammats att individer som normalt inte räknats till riskgrupperna (barn och unga), har insjuknat (MacFarland *et al.* 2007).

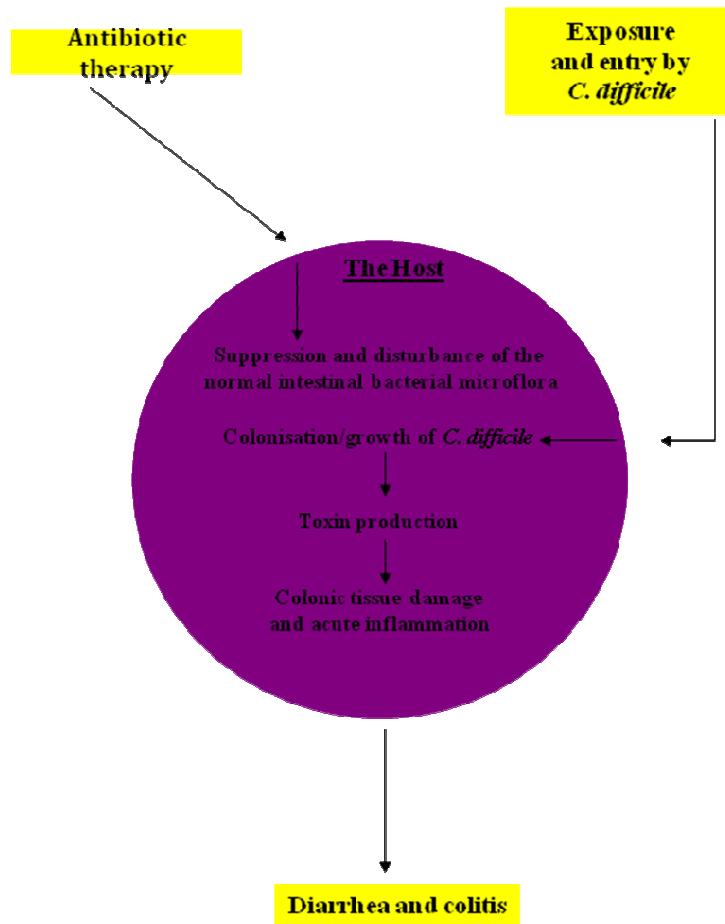
Enligt Smittskyddsinstitutet är CDI ett betydande folkhälsoproblem även i Sverige. Tidigare statistik har påvisat en ökning av CDI, från 58 fall per 100 000 invånare 1995 till 90 fall per 100 000 invånare 2007. Sjukdomen är inte anmälningspliktig i Sverige. Den nationella övervakningen av CDI i Sverige bygger därför på frivillig inrapportering av diagnostiserade fall från kliniska laboratorier. Första halvåret 2010 rapporterades över 2300 fall av CDI, trots att bara 16 av 28 laboratorier deltog i rapporteringen och underlag för incidensberäkning inte är fullständigt. Den epidemiologiska typningen visar dock att den hypervirulenta och internationellt spridda ribotypen 027 ännu inte etablerats i större omfattning i Sverige. Även i Sverige drabbas personer ute i samhället av CDI. Vid senaste mättillfället (vecka 11, 2010), framgår att de flesta fall av CDI rapporterades från sjukhuspatienter 75% (117/156), och 25% (39/156) provtogs på vårdcentral/annan plats (Smittskyddsinstitutet, 2010a).

## Patogenes

Infektion sker sannolikt genom fekal- oral transmission av sporer (Elliot *et al.* 2007). *Clostridium difficile* infektion är förknippat med användandet av antibiotika, eftersom den underlättar för bakterien att etablera sig och producera toxiner. Tarmfloran hos friska individer utgör en barriär, så kallad "colonization resistance" som skyddar mot infektionen. Vid rubbningar av normal tarmflora t.ex. genom antibiotikaterapi, möjliggörs för *C. difficile* att kolonisera tarmen. När infektionen är etablerad kan toxinerna ge upphov till blödning, vätskeackumulation och celldöd i tarmens slemhinna (Borriello, 1998). Toxinerna tas upp av celler i tarmslemhinnan genom receptor-medierad endocytos och verkar intracellulärt (Voth *et al.* 2005).

Sjukdomsbilden varierar mellan mildare och svårare former av diarré (CDAD), till en livshotande explosiv pseudomembranös kolit. PMC är väldefinierad histopatologiskt och avgränsar sig för det mesta till kolon och rektum. Efterhand som sjukdomen fortskrider nekrotiseras mukosan och bildar exsudativa membran, så kallade pseudomembran. Membranen ses som multipla gulvita plack av varierande storlek. Den underliggande submucosan är i varierande omfattning inflammerad och/eller nekrotiserad (Borriello, 1998).

## Pathway of *Clostridium difficile* Antibiotic-Associated Diarrhea (CDAD)



Karel Krovacek. 2007

## Patogenicitet

### Virulensfaktorer

En patogen bakterie har ett antal specifika genetiska och biokemiska egenskaper som bidrar till dess förmåga att utlösa sjukdom hos en värd. Man kallar dessa egenskaper för virulensfaktorer eller virulensdeterminanter.

## Toxiner

Fem olika toxiska faktorer som produceras av *C. difficile* har beskrivits, men endast två av dem (toxin A och B) har hittills kunnat relateras till klinisk sjukdom. Toxin A och B utgör *C. difficile* primära virulensfaktorer (Borriello, 1998). Toxinerna tillhör de största bakterietoxiner man känner till. Tillsammans med *C. sordelli* och *C. novyi* bildar *C. difficile* en grupp klostridier som producerar stora toxiska proteiner med påtagliga likheter sinsemellan. Toxin A och B, har molekylvikter på 308 kDa respektive 270 kDa och har 66% likhet (homologi) med varandra (Voth & Ballard, 2005).

Toxinerna utövar ett flertal olika biologiska effekter. De är båda cytotoxiska för en mängd olika celltyper. Andra effekter är ökad vaskulär permeabilitet och blödningar. I olika försöksdjursmodeller har man visat att toxin A orsakar vätskeackumulation i tarmen, medan toxin B inte gör det. Toxin A definieras därmed som ett enterotoxin (Borriello, 1998). Studier på cellkulturer in vitro har visat att toxin B är ett betydligt mer potent cytotoxin. Donta *et al.* (1982) rapporterade att toxin B var fyra till tusenfaldigt mer cytotoxiskt än toxin A beroende på vilken celltyp som användes i testet. Nyligen har också Kuenhe *et al.* (2010) visat att en virulent stam, där man ”stänger av” toxin A/B generna med knockout- teknik blir helt avirulent i en hamstermodell.

Det finns olika varianter av *C. difficile* stammar som skiljer sig genetiskt från varandra vad gäller förmågan att producera toxiner. Man betecknar dem som: tcdA+/tcdB+, tcdA+/tcdB-, tcdA-/tcdB+ eller tcdA-/tcdB-, utifrån vilka kombinationer av toxinkodande gener de har i genomet. Baserat på djurförsök trodde man i början att det var toxin A som var det viktigaste toxinet, vilket ensamt utlöste klinisk sjukdom. Senare har det dock visat sig att även toxin B ensamt kan utlösa CDI hos försöksdjur och människor (Kuehne *et al.* 2010; Kuijper *et al.* 2001). I en studie av Lyerly *et al.* (1985), fann man även att de båda toxinerna A och B tycks ha en synergistisk verkan.

Huvuddelen av patienter som drabbats av CDI har blivit smittade av stammar som är både toxin A och B positiva. Den högvirulenta stammen ribotyp 027, som orsakat många sjukdomsfall under 2000- talet kännetecknas av en utökad antibiotikaresistens och ökad produktion av båda toxinerna A och B. Ribotyp 027 producerar ytterligare ett toxin, det s.k. binära toxinet. Den kliniska betydelsen av detta toxin är ännu inte studerad i någon större omfattning och generna är ännu inte kartlagda. Det finns dock indikationer på att det binära toxinet kan kopplas till ökad virulens (MacFarland *et al.* 2007).

Både toxin A och B behöver ta sig in i sina målceller för att utöva sin toxiska effekt. Upptaget sker genom receptormedierad endocytos och toxinet transporteras sedan in i cellens cytoplasma. Inne i cellen fungerar toxinerna som enzymer. De är glykosyltransferaser som har förmågan att modulera en mängd fysiologiska reaktioner i cellen. Glykosyltransferaser medierar reaktioner som inkorporerar olika typer av sockergrupper till ett substrat. Genom att modifiera eller inaktivera signal/regulator-proteinerna rho, rac och cdc42 påverkas bl.a. cytoskelettet, transkription av RNA och ”tight junctions” mellan cellerna. Resultatet blir läckage av vätska ut i tarmlumen och/eller apoptos av celler (Voth & Ballard, 2005).



## **Adhesiva egenskaper**

Adhesion till celler är en viktig förmåga hos många bakteriella patogener för att de ska kunna utveckla sin virulens. För att en patogen bakterie ska kunna infektera sin värd måste den kunna binda/adherera till strukturer i vävnaden. Denna vidhäftningsförmåga är det första och mycket viktiga steget i samband med sjukdomsutveckling (Quinn *et al.* 2002).

Det första beviset för att *C. difficile* kunde binda till celler i tarmkanalen hos människa har beskrivits av Borriello (1979). I en hamstermodell har man visat att en högvirulent stam hade bättre adhesionsförmåga än en lågvirulent stam. Båda stammarna hade dock bättre adhesionsförmåga än en tredje avirulent icke- toxigen stam. En annan iakttagelse var att toxin A tycktes öka adhesionsförmågan. När toxin A administrerades tillsammans med den avirulenta stammen så blev adhesionsförmågan jämförbar med de virulenta stammarna (Borriello *et al.* 1988).

Vissa stammar av *Clostridium difficile* har fimbrier (6µm långa) och de flesta stammar är rörliga med hjälp av flageller. Dessa strukturers betydelse som eventuella adhesiner har ännu inte kunna visas och deras roll vid kolonisation är oklar (Borriello, 1998). Cellväggen hos *C. difficile* är svagt hydrofob och har en positiv laddning vilket gör att den skulle kunna bindas lättare till negativt laddade epitelceller (Krishna *et al.* 1996).

Taha *et al.* (2006) undersökte adherensförmågan hos *C. difficile* isolerade från humana patienter och hästar. I *in vitro* adhesionsförsöket användes humana tarmceller (Caco- 2) och tarmceller från häst. Samtliga isolat kunde adherera i varierande grad till tarmceller från både häst och människa. Humana isolat adhererade bättre till humana Caco- 2 celler medan hästisolaten adhererade bättre till hästceller. Det förefaller därför som om det fanns en värd- bakterieberoende tropism.

## **Kapsel**

Bakterier kan syntetisera extracellulära polymerer som sitter på cellväggen, dessa benämns glykokalyx. Hos vissa arter kan polymererna bilda ett tätt sittande yttre skikt kring bakterien, en s.k. kapsel. De flesta kapslar består av polysackarider och kan vara till hjälp för bakterien vid adhesion samt som skydd mot omgivningsmiljön. En annan funktion kan vara att undslippa immunförsvaret och på detta vis undgå fagocytos (Quinn *et al.* 2002). Davies & Borriello (1990) rapporterade fynd av kapsel hos samtliga 15 (nio toxigena och sex icke- toxigena) stammar som ingick i försöket. Med anledning av sina fynd har författarna diskuterat att kapselbildning inte tycks vara en egenskap som enbart är kopplad till virulenta stammar.

## **Kemotaxis och motilitet**

Kemotaxis innebär att en bakterie rör sig mot eller bort från stimulerande ämnen (Todar, 2010). Bakterier är rörliga med hjälp av flageller. Möjlighet att röra sig från tarmlumen ut mot tarmslemhinnan ökar möjligheterna för en enteropatogen

att fästa till receptorer (Borriello, 1998). Delmée *et al.* (1990), studerade 140 *C. difficile* isolat från människor fördelade på 10 olika serotyper. Huvuddelen av isolaten visade sig ha peritrika flageller. Avsaknad av flageller var vanligare inom några specifika serotyper. Ingen omedelbar koppling till virulens kunde göras. En annan forskargrupp kom dock fram till att en *C. difficile*-stam som hade flageller hade en tiofaldigt högre förmåga att fästa till slemhinnan i blindtarmen hos möss än en stam som saknade flageller (Tasteyre *et al.* 2001).

## Exoenzymer

För att framgångsrikt kunna etablera sig och invadera vävnad utnyttjar bakteriella patogener olika sätt att undkomma immunförsvaret och frigöra näringsämnen. Detta kan uppnås genom att utsöndra enzymer i sin nära omgivning s.k. invasiner, som bryter ned, skadar och förändrar strukturen hos den friska vävnaden. Exempel på sådana enzymer är kollagenas, hyaluronidas, lipas, hemolysin och fibrinolysin (Quinn *et al.* 2002; Todar, 2010). Förmågan hos *C. difficile* att producera exoenzymer har studerats. De flesta stammar som undersöktes producerade hyaluronidas, chondroitin-4-sulfatas och heparinas. De högvirulenta stammarna producerade även kollagenas. Överlag producerade högvirulenta stammar mer enzymer än lågvirulenta (Seddon *et al.* 1990). Det är möjligt att några av dessa enzymer bidrar till patogenesen vid CDI och det är troligt att enzymerna bidrar till bakteriens försörjning med näringsämnen (Borriello, 1998).

## Sjukdombild hos djur

*Clostridium difficile* infektioner har beskrivits hos flera djurslag, däribland häst, svin och kalvar.

CDI kan drabba både vuxna hästar och föl. Sjukdomsförekomsten är sporadisk och rapporteras över hela världen. Man talar ibland om "equine clostridiosis", då även *Clostridium perfringens* kan vara delaktig och bidra till sjukdomen. Vuxna hästar som insjuknar är vanligtvis under vård på sjukhus eller har behandlats med antibiotika, medan däremot föl kan insjukna utan att ovan nämnda riskfaktorer funnits med i bilden. Hos föl yngre än två veckor kan sjukdomsförloppet bli väldigt snabbt med hög mortalitet. Symtomen hos föl är en minskad lust att dia, ofta med samtidiga koliksymtom som blir mer och mer uttalade. Efterhand tillstöter vattnig riklig diarré som ibland är blodig som leder till att djuret blir svårt dehydrerat. Metabolisk acidosis och septisk chock är ytterligare komplikationer som kan uppstå i senare delen av sjukdomsförloppet (Radostits *et al.* 2007).

Hos vuxna hästar är symtomen en plötsligt insättande och mycket allvarlig kolit med vattnig diarré, dehydrering, toxinemi och metabolisk acidosis som följd (Båverud *et al.* 1997). I några fall har det även rapporterats om utbrott av CDI i hela grupper av hästar på sjukhus (Radostits *et al.* 2007). Även ston till sjuka föl med lunginflammation som behandlats med rifampicin och erytromycin har insjuknat i CDI (Båverud *et al.* 1998). Tillståndet är livshotande och behandlingen måste vara aggressiv.

Behandlingen av hästar inriktar sig på att återställa vätskebalans och elektrolyt-rubbningsar samt korrigerar metabolisk acidosis. Om behandling med antibiotika är aktuell är det metronidazol och vankomycin som är verksamma preparat (Radostits *et al.* 2007).

CDI hos svin har under senare år diskuterats som ett ökande problem i USA (Songer & Andersson, 2006). Framförallt är det neonatala spädgrisar som drabbas. Kulningarna får en gulaktig slemmig, ibland blodig diarré. De blir snabbt dehydrerade med förhöjd dödlighet i kullarna (Radostits *et al.* 2007). Songer *et al.* (2000) har spekulerat i att användningen av profylaktisk antibiotika inom svinnäringen skulle kunna vara en av bakomliggande orsaker till CDI hos spädgrisar.

*Clostridium difficile* har också beskrivits som en orsak till kalvdiarré (Rodrigues-Palacios *et al.* 2006; Hammit *et al.* 2008). Rodrigues-Palacios *et al.* undersökte kalvar i Kanada och rapporterade att *C. difficile* toxin detekterades hos 40% av kalvar med diarré (totalt 144st), och hos 21% av kalvar utan diarré (totalt 134st). Isolering av bakterien gjordes från 8% av kalvar med diarré och från 15% av kalvar utan diarré. Utifrån detta diskuterade författarna att kalvar kan vara en reservoar för *C. difficile* och att den kan vara en av orsakerna till enterit hos kalvar.

Toxinproducerande *C. difficile* har hittats hos både sjuka och friska hundar men dess roll är ännu inte klarlagd (Clooten *et al.* 2008).

## **Sjukdomsbild hos människor**

Den klassiska presentationen av CDAD är en vattnig diarré som uppträder i samband med antibiotikaterapi. Hos en mindre del av patienter (< 5%) ses även en blodtillblandning i diarrén. De flesta antibiotikatyper har historiskt förknippats med CDAD. Till och med vankomycin och metronidazol som används för att behandla CDI kan utlösa sjukdomen (Yoo & Lightner, 2010). Om *C. difficile* är resistent mot ett visst antibiotikum ökar risken för att drabbas av CDAD (Gerding, 2004). Klindamycin, cefalosporiner och kinoloner är antibiotikagrupper som förknippats med högre risk för CDAD (Barbut & Petit, 2001; Gerding, 2004). Inom dessa antibiotikagrupper uppvisar *C. difficile* varierande känslighet (Heejeun *et al.* 2010; Norén *et al.* 2010).

De flesta personer som insjuknar får feber och har smärtor i nedre delen av buken. Sjukdomsbilden varierar mellan mildare och svårare former av diarré, till en livshotande PMC (Borriello, 1998). Diarrén kan leda till svåra tillstånd med svullnad och utspändhet i buken, dehydrering, och metabolisk acidosis. I riktigt allvarliga fall löper patienten även risk för sepsis och organsvikt. Även extraintestinala komplikationer som cellulit, nekrotiserande fasciit och polyartrit har rapporterats. På grund av variationen i symtombilden bör behandlande läkare alltid ha med CDI som en differentialdiagnos för högriskpatienter med diarré (Yoo & Lightner, 2010). Infektionsdosen är i dagsläget inte definierad och behöver klarläggas (Gould & Limbago, 2010).

## Diagnostik/Identifiering

Diagnostiken av *C. difficile* omfattar påvisande av mikroorganismen genom odling kombinerat med detektering av dess toxiner, specifikt enzym eller toxingener i faeces. I den s.k. "golden standardmetoden" studerar man toxinets cytotoxiska effekt på en cellkultur.

Samtliga metoder är framtagna för att kunna analysera feaces från personer med misstänkt CDI. Golden standardmetoden som beskrivs mer ingående under rubriken toxin B, togs fram mot slutet av 1970- talet och användes under många år som standardmetod för att ställa diagnos. Metoden anges som referensmetod med hög specificitet och känslighet, speciellt när den kombineras med odling (Planche *et al.* 2008). Under senare år har ett antal nya metoder tagits fram för att möjliggöra snabbare och mer lätthanterlig diagnostik. En grupp av tester är de s.k. "enzyme immunoassays" (EIA) som riktas mot toxin A eller A/B eller glutamindehydrogenas (GDH) som är ett metaboliskt enzym, specifikt för *C. difficile*. Reverse transcriptase PCR teknik (RT- PCR) har också utvecklats och detekterar generna *tcdA* och/eller *tcdB* med hög känslighet. De olika testerna har varierande känslighet och specificitet (tabell 1).

Vid identifiering av isolat finns även andra biokemiska tester som kan göras för att verifiera fynd av *C. difficile*. Dessa har beskrivits utförligare under Material och metoder.

Tabell 1. Diagnostiska tester för *Clostridium difficile* (Bartlett, 2010)

Test	Substance detected	Time required	Sensitivity* %	Specificity* %	Concerns and comments
Cytotoxin	Toxin B	1-3 days	95	90-95	Long time required and technical demands; rarely used now
Toxin culture	Toxigenic <i>C. difficile</i>	3-5 days	>95	80-90	Long time required and technical demands; rarely used in US
EIA toxin A or A/B	Toxin A or A/B	Hours	75-80	97-98	False-negative results, but rapid and not technically difficult; used by most US laboratories in 2008
EIA GDH	<i>C. difficile</i>	Hours	95-100	70-80	Some variations in reported sensitivity and nonspecificity
EIA GDH and toxin A/B	<i>C. difficile</i> and <i>C. diff.</i> toxin	Hours	95-100	97-98	Results depend on the toxin test
RT-PCR	Toxigenic <i>C. difficile</i>	Hours	>98	80-99	Nonspecificity attributed to carriers

Note: EIA, enzyme immunoassay; GDH, glutamine dehydrogenase; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction. \* Reported data for sensitivity and specificity are based on multiple reports. It is assumed that 20%- 30% of hospitalized patients are colonized with *C. difficile* and that 50% strains are toxigenic. Clinical correlations are always important but are especially important with RT-PCR and EIA tests for GDH.

Vid epidemiologiska studier eller smittspårning behöver man kunna kartlägga vilka stammar (typning av bakterier) som ligger bakom sjukdomen och följa deras spridning.

*Clostridium difficile* kan delas in i mer än 150 ribotyper och 24 toxinotyper. Ett exempel på detta är den hypervirulenta varianten ribotyp 027, toxinotyp III. Ribotypning och toxinotypning utförs med hjälp av PCR- teknik. Vid toxinotypning undersöker man ett område i bakteriens genom som benämns patogenicitetsloкус, där generna för toxin A/B finns. Vid ribotypning amplifieras bakteriens ribosom- RNA (rRNA). Sedan jämförs vissa regioner i bakteriens rRNA (Karlsson, 2009).

Det finns även en metodik för serotypning av *C. difficile*. Med hjälp av antisera kan man utföra s.k. "slide agglutination" och tilldela isolat en grupp tillhörighet som omfattar 10 olika serogrupper med benämning A, B, C, D, F, G, H, I, K och X (Delmée *et al.* 1990).

## Behandling och prevention av CDI hos människor

### Behandling

När diagnosen har ställts avbryts eventuell pågående medicinering med den antibiotika som har utlöst sjukdomen. Understödjande behandling ges för att återställa rubbningar i vätskebalans och elektrolyter. Mediciner som kan ha antiperistaltisk effekt ska undvikas. Patienten måste isoleras och hanteras med rigorös hygien för att undvika spridning av sporer till andra patienter.

Beroende på allvarlighetsgraden av CDAD kan det bli nödvändigt att behandla med antibiotika. Standardbehandling innebär användning av metronidazol eller vankomycin i 10- 14 dagar eftersom *C. difficile* vanligtvis är känslig för dessa antibiotika. En fördel med metronidazol är att det kan ges intravenöst. Cirka 10%-25% av behandlade patienter med CDAD får återfall. Till viss del kan återfallen bero på avsteg från ordinerad medicinering eller felaktig diagnos, men i övrigt är de bakomliggande orsakerna okända (Yoo & Lightner, 2010).

Det finns också några alternativa behandlingsmetoder för CDAD. Parallellt med medicinering med vankomycin eller metronidazol kan man ge anjonbindande resiner, t.ex. colestipol eller cholestyramin. De hjälper till att binda upp *C. difficile*- toxiner i tarmen och skyndar på deras utsöndring från tarmen. Ett problem med resiner är att de även binder vankomycin, så de kan inte administreras tidsmässigt närliggande med vankomycin (Yoo & Lightner, 2010).

Probiotika har föreslagits som en kompletterande behandling för att snabbare återställa normal tarmflora. Det finns ännu inte tillräckligt med studier inom området för att stödja denna behandling (Yoo & Lightner, 2010).

Fekal bakterieterapi har under senare år utvärderats som en ny och lovande metod att behandla CDI. Metoden innebär att donatorfaeces från en frisk person blandas upp med NaCl och förs in rektalt som ett enema, eller genom långsam infusion via en nasoduodenal sond. Lösningen (rektalt enema) skall verka i 6- 8 timmar och

hjälp till att återetablera en fungerande tarmflora i tjocktarmen. Metoden har utvärderats i olika studier och visat mycket goda resultat. I cirka 90% av dokumenterade fall anses behandlingen ha varit framgångsrik (van Nood *et al.* 2009; Yoo & Lightner, 2010). Van Nood *et al.* (2009) har även diskuterat att fekal bakterieterapi kan bli en användbar behandlingsmetod för patienter med återfall i CDI.

### *Prevention*

För närvarande finns inget vaccin mot infektion orsakad av *C. difficile*.

Sjukhusmiljö betraktas som en signifikant reservoar för *C. difficile* då patienter utsöndrar både bakterier och dess sporer och som därför lätt kan spridas till andra. Flera undersökningar beskriver att *C. difficile* sporer har kunnat isoleras från omgivningen till dessa patienter (Al Saif & Brazier, 1996; Barbut & Petit, 2001). Dessutom finns asymtomatiska bärare av *C. difficile*. Sporena sprids lätt då de fastnar på personalens händer, utrustning och inredning. De är resistenta mot de flesta vanligaste desinfektionsmedel och kan därför överleva i månader i sjukhusmiljön. Desinfektion måste därför ske med medel som har en god sporicid effekt. Klorinnehållande desinfektionsmedel är ett sådant exempel på en bra sporicid effekt. De vanliga alkoholbaserade desinfektionsmedel är däremot närmast utan effekt (MacFarland *et al.* 2007; Gould & Limbago, 2010).

Bättre vårdhygieniska åtgärder såsom noggrann handhygien och städning men framförallt en allmän återhållsamhet med antibiotika är en förutsättning för att förebygga *C. difficile* infektion (MacFarland *et al.* 2007). Ytterligare en svårighet i att begränsa spridning utgörs av att *C. difficile* sporer tycks kunna spridas i luft, vilket har visats i en pilotstudie på ett Brittiskt sjukhus (Roberts *et al.* 2008).

Flera europeiska länder, inklusive Sverige, har infört nationella övervakningsprogram med regelbunden provtagning av patienter. Resultaten rapporteras och sammanställs så att det blir möjligt att följa trender med t.ex. hypervirulenta stammar och antibiotikaresistens. Detta möjliggör att samordna strategier för att förhindra och följa smittspridningen inom och mellan länder (MacFarland *et al.* 2007; Smittskyddsinstitutet, 2010b).

## **FÖREKOMST OCH KARAKTÄRISERING AV *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* FRÅN FRISKA HUNDAR**

### **Syfte**

Syftet med detta arbete var att studera förekomst av *C. difficile* i faeces från svenska hundar samt karaktärisering av isolat avseende toxinproduktion och antibiotikaresistensmönster.

### **MATERIAL OCH METODER**

#### **Provtagningsmaterial och provtagningsmetodik**

Faecesprover från 50 hundar, 19 tikar och 31 hanhundar, samlades in under perioden december 2007 till augusti 2009. Hundarna hörde till olika hushåll inom Stockholm- Uppsala regionen. Åldern varierade mellan 8 månader och 12 år. Hundar yngre än 6 månader togs inte med i studien p.g.a. att dessa troligtvis inte till fullo har utvecklat en vuxen hunds tarmflora. Endast hundar som var klinisk friska deltog i studien. Huvuddelen av hundarna provtogs i anslutning till sina hem och en mindre del provtogs vid besök på universitetsdjursjukhuset SLU, Uppsala. Definitionen av kliniskt frisk i denna studie innebar att endast hundar som inte uppvisade sjukdomssymtom med påverkan på allmäntillståndet, akut eller kronisk diarré, eller annan gastrointestinal sjukdom inkluderades.

En enkät med anamnestisk information fylldes i av djurägaren. Enkäten innehöll frågor om ägaruppgifter, ålder, kön, klinisk status, ev. sjukdomshistorik, utfodring, boendeform och om djuret behandlats med något läkemedel.

Proverna samlades in i samband med defekering. För att förhindra kontaminering plockades 10- 20 gram av faeces försiktigt upp med sked samtidigt som material från marken undveks i möjligaste mån. Faeces fördes sedan över till ett provtagningsrör som förvarades nedkyllt. Samtliga prover undersöktes i laboratorium inom 12 timmar efter provtagning.

#### **Odling**

Provmaterial ströks med steril plastögla på *C. difficile* selektivagar (CM0601 Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) med tillsats av moxalaktam och norfloxacin (SR0173E Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) samt 5% hästblod (SVA, Uppsala, Sverige). Agarplattan inkuberades anaerobt i 48 timmar vid 37°C.

Cirka fem gram av provmaterial blandades upp i 10 ml anrikningsbuljong (CM0601 medium utan agar) och inkuberades anaerobt vid 37°C under 10 dygn. Efter inkubering ströks material från anrikningsbuljongen på *C. difficile* selektivagar samt på Fastidious anaerobe agar (FAA) innehållande 5% hästblod (SVA). Agarplattorna inkuberades anaerobt i 48 timmar vid 37°C. Alkoholchock för sporselektering utfördes genom att blanda 3ml homogeniserad

anrikningsbuljong (efter 10 dygns inkubering) med 3 ml av 96% etanol. Efter 50 min i rumstemperatur centrifugerades (7. 500 rpm) proverna och sedimentet tvättades två gånger med steril fysiologisk NaCl. Därefter ströks material från sedimentet på *C. difficile* selektivagar och FAA- agar som inkuberades anaerobt i 48 timmar vid 37°C.

## Identifiering

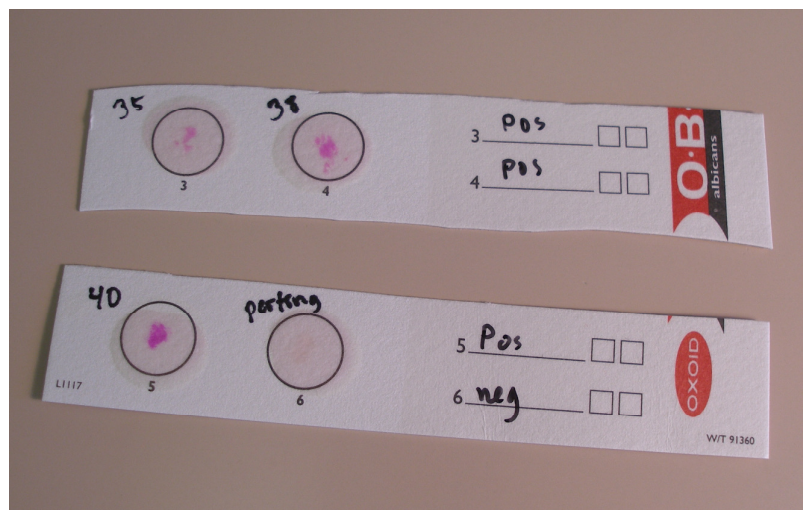
Efter 48 timmars inkubering avlästes *C. difficile* selektivagar och FAA agarplattor. Misstänkta kolonier ströks vidare på FAA- agar. Presumptiva isolat valdes ut på grundval av bakteriens kolonimorfologi, gramfärgning och karakteristisk lukt. För jämförelse och kontroll odlades en referensstam av *C. difficile* parallellt.

Två tester användes för att slutgiltigt välja ut presumptiva *C. difficile* isolat: i) latex agglutinationstest för detektion av *C. difficile* antigen (*C. difficile* testkit DR1107A Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), ii) L- prolin aminopeptidastest (O.B.I.S ID0700, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom).

Dessa isolat identifierades vidare till artnivå genom sekvensering av 16S ribosom RNA.

## L- prolin aminopeptidastest

L- prolin aminopeptidastest används för att identifiera närvaron av enzymet L- prolin aminopeptidas som produceras av *C. difficile*. Testet inkluderar testkort impregnerade med L- prolanyl, 7 amido- 4- methylcoumarin, där material från en bakteriekoloni appliceras. Därefter tillförs en reagens, och området antar en klar magentafärg när enzymet L- prolin aminopeptidas finns närvarande.

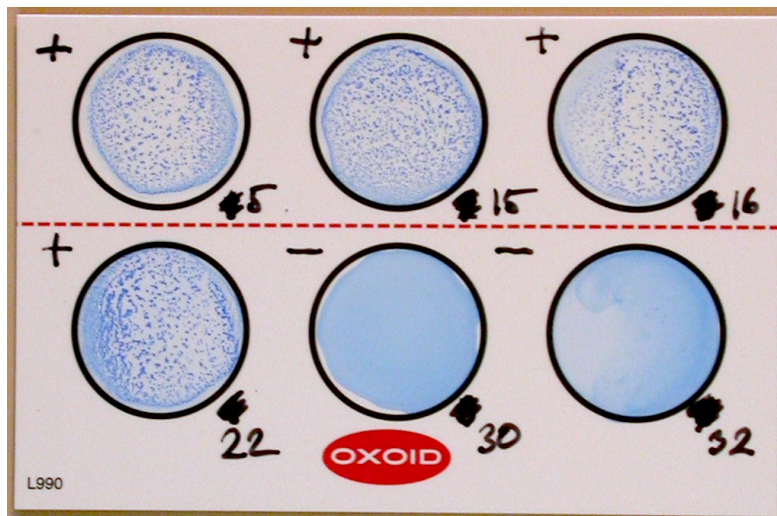


L- prolin aminopeptidastest. Foto: K-J Wetterwik



## Latex agglutinationstest

Principen för testet bygger på antikroppar som är specifika för ett cellväggsantigen i *C. difficile*. Antikropparna sitter på mikroskopiska blå latexkorn. Man använder en testbricka där en droppe latexreagens blandas med bakteriesuspension. Vid positivt resultat syns en agglutinationsreaktion på testbrickan inom två minuter. Tillverkaren uppger att korsreaktivitet kan förekomma med *Clostridium sordelli*, *Clostridium bifermentans* och *Clostridium glycolicum*.



Latex agglutinationstest. Foto: K-J Wetterwik

## Sekvensering

Sekvenseringar utfördes i samarbete med enheten för bakteriologi (SVA). Kolonier plockades från agarplattor med isolat av *C. difficile* i renspridning, och blandades till en buffrad suspension. Preparering av DNA enligt protokoll för utvinning av DNA från primära prover utfördes med EZ1 biorobot (Qiagen GmbH, Tyskland). 16S rRNA- gener amplifierades med en uppsättning primers konstruerade för fylum *Firmicutes*.

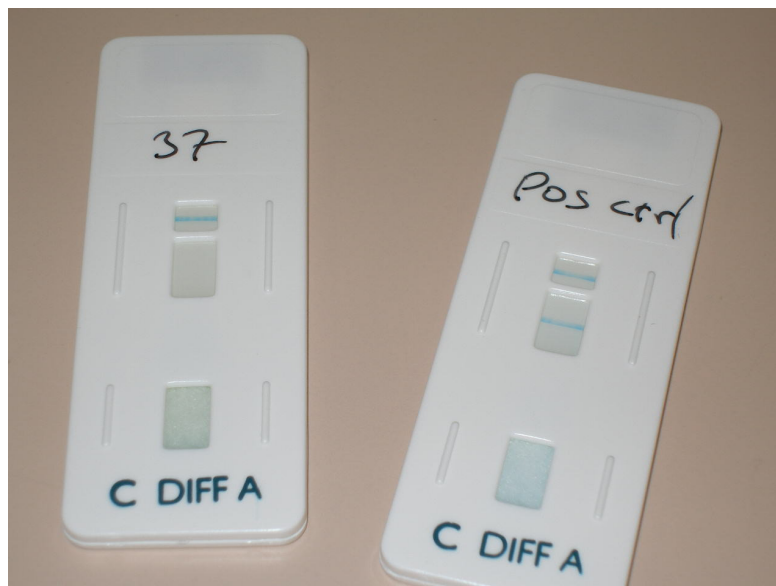
Produkternas sekvenser bestämdes genom cykelsekvensering med en DNA-sekvensator (ABI prism® 3100, Applied biosystems, Kalifornien, USA) och fluorescensmärkta terminatorer. Sekvenssegmenten sammanfogades till s.k. kontiger genom att använda särskild programvara (Contig Express, Informax, Bethesda MD, USA). Kontroll och redigering av kontiger utfördes manuellt innan de slutligen jämfördes i GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, USA) med tidigare deponerade sekvenser.

Ett fylogenetiskt träd konstruerades enligt "neighbourhood joining- metoden" och en distansmatris skapades. Gensekvenserna för 16S rRNA kontrollerades och "alignades" (d.v.s. organisering av sekvenserna i rader där varje kolumn innehåller homologa positioner) manuellt mot referenssekvenser för typstammar ur *Bacillus* spp. och *Clostridium* spp. Distansmatrisen, som korrigerades för multipla substitutioner, omfattar 1284 nukleotidpositioner, vilka motsvarar position 50 till 1403 i 16S rRNA sekvensen för *Escherichia coli*.

## Toxinproduktion

### Toxin A

Toxin A- test utfördes med hjälp av *C. difficile* testkit DR1107A Oxoid, Basingstoke, United Kingdom. Testet utgör en snabb immunoanalys för direkt kvalitativ detektering av toxin A i faecesprov från humana patienter. Testfältet innehåller monoklonala antikroppar mot toxin A. En liten mängd faeces blandades upp med 1 ml steril spädningsvätska och centrifugerades sedan enligt testets instruktioner. Från supernatanten fördes 125µl över med pipett till provrutan på testplattan. Efter 30 minuter lästes testet av. En blå linje i resultatfönstret indikerar en positiv reaktion d.v.s. närvaro av toxin A. Som positiv och negativ kontroll användes bifogade suspensioner ur testkitet.



Toxin A- test. Foto: K-J Wetterwik

### *Toxin B*

Testmetoden anges som "golden standard method" för att fastställa *C. difficile* infektion hos patienter (Planche *et al.* 2008). Till testet användes *C. difficile* Toxin/Antitoxin Kit (Techlab, Blacksburg, USA). Metoden bygger på att man påvisar och neutraliserar cytotoxisk/cytopatisk effekt i Vero (green monkey kidney) celler.

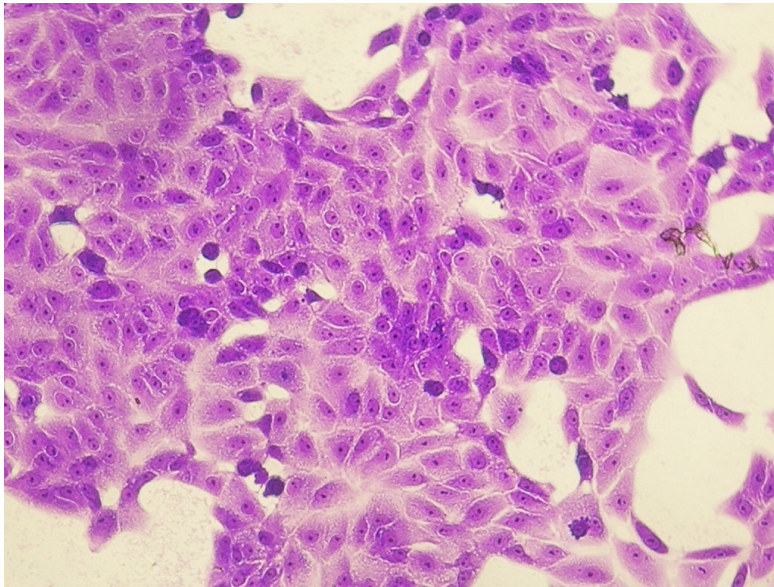
Samtliga L- prolin peptidas positiva klostridiestammar (*C. difficile*, *C. hiranonis* och *C. glycolicum*) som isolerats och sekvenserats testades.

Vero celler (SVA, Uppsala, Sverige) odlades i cellodlingsflaskor i CO<sub>2</sub> inkubator 37°. När cellerna vuxit ut i ett jämnt lager hällades komplett medium (EMEM, SVA, Uppsala, Sverige) med 10% fetalt kalvserum av, och cellerna trypsinerades därefter under två minuter. När cellerna lösgjort sig från varandra blandades de upp med ett nytt komplett medium till en cellsuspension med en koncentration av ca. 200.000 celler/ml. 200 µl av suspensionen fördes över till brunnarna på en 96-hålsplatta och inkuberades sedan 24h i CO<sub>2</sub> inkubator vid 37°C tills ett enkelt cellager erhöles i botten på brunnarna.

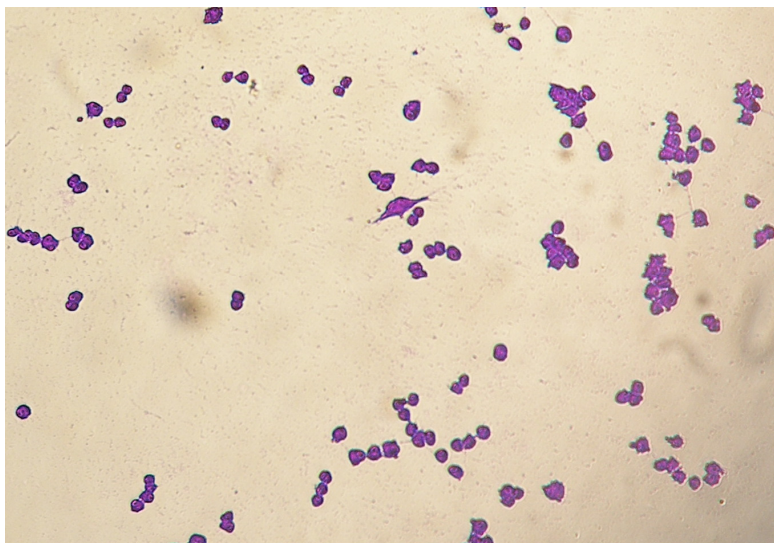
Samtliga bakterieisolat odlades anaerobt i 10 ml Brain heart infusion (BHI) under ett dygn. Efter centrifugering av buljongen sterilfilterades supernatanten (0,22µm Milliporefilter). De sterila kulturfiltraten spädades därefter med steril fosfatbuffert (PBS) till en spädning 1:10. Tjugo µl av det ospädda och det spädda sterilfiltratet överfördes till respektive brunn på 96- hålsplattan för att sedan inkuberas 24 timmar vid 37°C.

Som positiv kontroll användes toxin B- reagent som finns med i testet. Negativ kontroll utgjordes av steril PBS. Resultatet av den positiva kontrollen skall vara den så typiska "cellavrundningen" d.v.s. cytotoxisk/cytopatisk effekt som *C. difficile* toxin framkallar.

Att bara konstatera att celler har destruerats och utsatts för cytotoxisk påverkan räcker dock inte för att fastställa närvaro av *C. difficile* toxin B. Även andra bakterier är kapabla att producera toxin med liknande effekt. Testet innehåller därför även ett neutralisationstest. Som positivt resultat bedöms celler som uppvisar en cytotoxisk effekt, som sedan kan neutraliseras med specifikt *C. difficile* antitoxin.



*Normala Veroceller. Foto: K-J Wetterwik*



*Cytotoxisk effekt "cellavrundning" i Verocelltest. Foto: K-J Wetterwik*

### **Antibiotikaresistensbestämning**

Utvalda isolat skickades till Smittskyddsinstitutet (SMI, Solna, Sverige), för resistensbestämning. Resistensbestämning utfördes med Etest (BioMérieux sa. Marcy, l'Etoile, Frankrike) .

## RESULTAT

*Clostridium difficile* isolerades från två (4%) av de 50 kliniskt friska hundarna. Båda isolaten växte på *C. difficile* selektivagar med en karakteristisk lukt och testades positivt i L- prolin aminopeptidas och i *C. difficile* latex agglutinations-test. Inget av isolaten producerade toxin A eller B (tabell 3). Artidentifiering av de två *C. difficile* stammarna gjordes med hjälp av 16S rRNA sekvensering (tabell 3 och 4).

Tio andra isolat undersöktes också. De liknade *C. difficile* avseende makro och mikromorfologi, men saknade den karaktäristiska lukten. Alla tio isolat var positiva för L- prolin aminopeptidas, men endast 6 av 10 var positiva i *C. difficile* latex agglutinationstest. Endast ett av isolaten växte på *C. difficile* selektivagar (tabell 3). Resultatet av 16S rRNA sekvensering för bestämning till artnivå visade att bakterierna tillhörde arterna *C. hiranonis*, 8 (16% av hundar), *C. glycolicum*, 1 (2% av hundar) och *Allobaculum stercoricanis*, 1 (2% av hundar) (tabell 3 och 4). Samtliga klostridier var cytotoxinnegativa i Verocelltestet.

Ytterligare ett isolat sekvenserades. Det hade en *C. difficile*- lik växt på FAA-agar, men var negativ i biokemiska tester och hade ingen *C. difficile* typisk lukt. Vid mikroskopering syntes stora sporer med en svart prick i ena änden. Bakterien hittades hos två hundar och ett av isolaten sekvenserades. Resultatet av sekvenseringen visade att bakterien tillhörde arten *C. paraputrificum*, 2 (4% av hundar) (tabell 3 och 4).

Resultatet av antibiotikaresistensbestämning av de utvalda klostridieisolaten redovisas i tabell 2. Det är intressant att ett av *C. difficile*- isolaten (nr 35) uppvisar resistens (64 mg/l) mot metronidazol. Provet togs från en 12- årig hanhund som behandlats med metronidazol en månad tidigare. *C. difficile* är normalt känslig för metronidazol och resistens mot detta antibiotikum anses vara mycket ovanligt. Smittskyddsinstitutet gjorde med anledning av detta en utökad resistensundersökning. Efter två på varandra följande frysningar och kultiveringar av isolatet avtog gradvis resistensen ned till en nivå på 2 mg/l. Denna typ av avtagande metronidazolresistens hos *C. difficile* har tidigare beskrivits som s.k. ”heteroresistens” (Peláez *et al.* 2008).

Båda isolat av *C. hiranonis* var resistent mot erytromycin. Resistensundersökningar avseende *C. hiranonis* har till min kännedom inte gjorts tidigare (tabell 2).

Tabell 2. Antibiotikaresistensbestämning, MIC-värden mg/l

Isolat efter sekvensering	metronidazol	vankomycin	klindamycin	erytromycin	moxi-floxacin
<i>C. difficile</i> /35	64	0,5	0,5	1,0	1,0
<i>C. difficile</i> /38	0,064	0,5	2,0	2,0	1,0
<i>C. hiranonis</i> /16	0,032	0,25	1,0	>256	0,125
<i>C. hiranonis</i> /22	0,064	0,25	2,0	>256	0,125
<i>C. glycolicum</i> /40	0,125	0,5	64	8,0	0,5

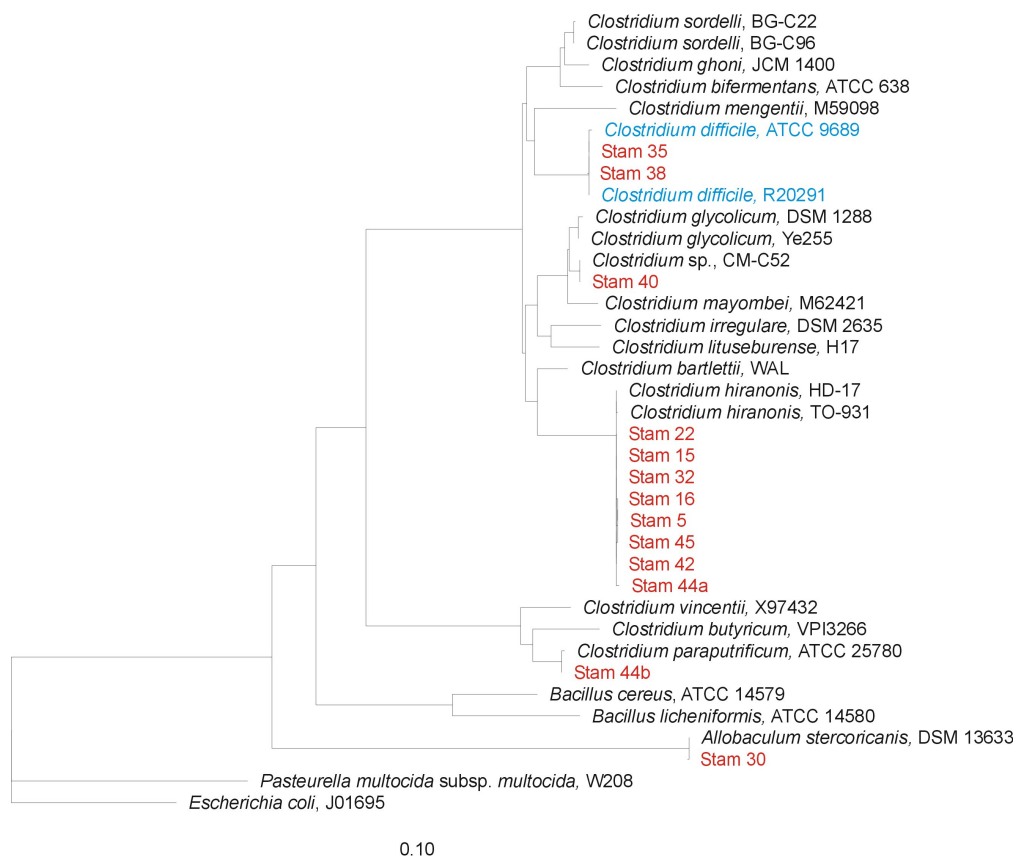
Brytpunkten för *C. difficile* känslighet för metronidazol: 1mg/l (Smittskyddsinstitutet 2010)

Tabell 3. Resultat av sekvensering och andra tester

Isolat efter sekvensering	Växt på selektiv-agar	Karakteristisk lukt på *FAA-agar	L- prolin amino-peptidastest	Latex test	<i>C. difficile</i> -toxin	
					A	B
<i>C. difficile</i> /35	+	+	+	+	-	-
<i>C. difficile</i> /38	+	+	+	+	-	-
<i>C. glycolicum</i> /40	+	-	+	+		
<i>C. hiranonis</i> /5	-	-	+	+		
<i>C. hiranonis</i> /15	-	-	+	+		
<i>C. hiranonis</i> /16	-	-	+	+		
<i>C. hiranonis</i> /22	-	-	+	+		
<i>C. hiranonis</i> /32	-	-	+	-		
<i>C. hiranonis</i> /42	-	-	+	+		
<i>C. hiranonis</i> /44a	-	-	+	-		
<i>C. hiranonis</i> /45	-	-	+	-		
<i>C. paraputrificum</i> /44b	-	-	-	-		
<i>A. stercoricanis</i> /30	-	-	+	-		

\*Karakteristisk lukt är mest uttalad på FAA- agar

Tabell 4. Sekvenserade isolat i fylogenetiskt träd



## DISKUSSION

*Clostridium difficile* infektion är en vanligt förekommande nosokomial sjukdom hos människor. Bakteriens sjukdomsframkallande egenskaper beskrevs redan på 1970- talet. Antalet infektioner är idag fortsatt högt eller ökande i flera länder. På senare år har det också rapporterats att personer ute i samhället och individer som inte tillhör vanliga riskgrupper har insjuknat (MacFarland *et al.* 2007).

*Clostridium difficile* orsakar också infektioner hos flera djurslag, däribland häst, svin och kalvar. Bakteriens roll hos hundar är i nuläget inte klarlagd (Clooten *et al.* 2008). Det har diskuterats om hundar kan utgöra en reservoar för *C. difficile* och om bakterien kan ha en zoonotisk potential (Borriello, 1983; Gould & Limbago, 2010).

En begränsad mängd undersökningar avseende förekomst av *C. difficile* hos hundar har gjorts. Studierna har omfattat både friska hundar och hundar med diarré och resultaten är varierande. *Clostridium difficile* infektion har av flera författare beskrivits som en "emerging disease" och bakterien har därför en hög aktualitet (Macfarland *et al.* 2007; DuPont & Garey, 2010). Hos hundar är dock



kunskapsunderlaget ringa, både vad gäller förekomst av bakterien och dess potentiellt sjukdomsframkallande roll.

Vissa författare som studerat förekomst av *C. difficile* hos friska hundar har rapporterat resultat som inte stämmer särskilt väl med varandra. Cave *et al.* (2002) fann 55%, Borriello (1983) 21%, Zerbini & Ossiprandi (2007) 20% och Weese *et al.* (2010) fann 10% förekomst av *C. difficile*. I andra undersökningar har man helt misslyckats med att påvisa förekomst av *C. difficile* (Struble *et al.* 1994; Mentula *et al.* 2005).

Studier kring toxinproduktion hos isolat från friska hundar har också visat sig vara varierande. Borriello (1983) fann att majoritet av isolaten var icke- toxigena, medan Weese *et al.* (2010) fann det motsatta förhållandet.

Resultatet av den här pilotstudien visar låg förekomst (4%) av *C. difficile* hos undersökta hundar. Ingen av de isolerade stammarna producerade toxiner. Med tanke på att *C. difficile* har rapporterats som förekommande i omgivningen, kan det kanske vara rimligt att anta att en mindre del av hundarna exponeras för *C. difficile* sporer. Det har även tidigare beskrivits att människor (3%- 5%) kan vara asymtomatiska bärare av *C. difficile* (Gould & Limbago, 2010) . Denna nivå tycks vara jämförbar med resultatet av denna pilotstudie.

Hur kommer det sig att de olika studierna avseende förekomst hos hundar har så olika resultat? Orsakerna kan vara flera. En rimlig förklaring är att förekomsten i omgivningen av *C. difficile* varierar betydligt mellan länder och regioner. Detta skulle t.ex. kunna förklara de stora skillnader som finns mellan rapporter från Nordamerika och Europa avseende bakteriens förekomst i köttprodukter. Användningen av antibiotika är också varierande i olika länder vilket kan ha betydelse i sammanhanget. En annan orsak kan vara skillnader i hur den laborativa metoden utförs. Några författare har valt att frysa faeces vid insamlingen och har heller inte gjort någon anrikning. Sporselektering används inte i alla rapporter och man använde dessutom olika typer av selektiva substrat. Inkubationstiden för anrikning varierar också i olika studier. Det finns också variation i användningen av konfirmeringstester och metoder för artbestämning. Skillnader i metoder mellan de olika studierna har betydelse för tolkning av resultat och bör beaktas vid jämförelse av olika rapporter.

Även andra ovanliga bakteriearter som *Clostridium glycolicum*, *C. hiranonis* och *Allobaculum stercoricanis* isolerades. Dessa mikroorganismer hade en *C. difficile*-liknande morfologi och uppvisade i varierande grad positiv reaktion i de biokemiska tester som har används för identifiering av *C. difficile*.

Det har tidigare rapporterats att *C. glycolicum* kan uppvisa positiv reaktion i *C. difficile* latex- agglutinationstest och i L- prolin aminosyrestest. Bakterien har även visat sig kunna växa på *C. difficile* selektivagar (Brazier & Hooker, 1990; Fedorko & Williams, 1997). *Clostridium glycolicum* isolatet i den här pilotstudien växte också på *C. difficile* selektivagar. *Clostridium glycolicum* har beskrivits som orsak till sporadiska infektioner (sårintektioner, abscessbildning, bakteriemi och sepsis) hos både människor och djur (Jiang *et al.* 2009).



*Clostridium hiranonis* isolerades från 8 hundar i studien. Bakterien beskrevs första gången av Kitahara *et al.* (2001) då den isolerades från människa. Endast ett fåtal rapporter finns publicerade om denna bakterie. Kitahara *et al.* (2001) har spekulerat i att denna bakterie skulle kunna kopplas till förhöjda nivåer av sekundära gallsyror, vilket kan ses vid koloncancer.

Enstaka studier beskriver isolering av *C. hiranonis* från hundar (Mentula *et al.* 2005; Suchodolski *et al.* 2006). Mentula *et al.* beskrev sina fynd som en ”*C. hiranonis*- liknande” organism efter isolering och sekvensering. Suchodolski *et al.* detekterade bakterien med PCR- teknik, utan att isolera den. Dessa författare har diskuterat att bakterien kan förekomma hos hundar, vilket överensstämmer med resultatet av denna undersökning. I den här studien har *C. hiranonis* isolerats från 8 hundar. Vid sekvensering uppvisar flera isolat 99,9% - 100% likhet med typstammen vilket med säkerhet bekräftar fynden. Samtliga *C. hiranonis* stammar uppvisade positiv reaktion för L- prolin aminopeptidas, vilket tidigare beskrivits av Kitahara *et al.* (2001). Majoriteten (5 av 8) av *C. hiranonis* stammar uppvisade även positiv reaktion i latex- agglutinationstest för *C. difficile*. Till min kännedom har detta inte rapporterats tidigare. I denna studie växte inte *C. hiranonis* på *C. difficile* selektivagar, medan Mentula *et al.* (2005) har rapporterat att bakterien kan växa på *C. difficile*- selektiva substrat.

*Allobaculum stercoricanis* är en annan nyupptäckt bakterieart som isolerades från en hund 2004. Endast en artikel finns publicerad om denna bakterie (Greetham *et al.* 2004). Dessa författare gjorde även en ”screening” bland 21 hundar och fann att bakterien förekom hos ett flertal av dessa. I föreliggande studie var bakterien positiv i L- prolin aminopeptidastest, vilket till min kännedom inte är beskrivet tidigare.

Observationer beskrivna ovan kan vara till hjälp för andra kommande arbeten rörande *C. difficile* förekomst hos hundar. Dessa bakteriearter kan förväxlas med *C. difficile*, både avseende morfologi och biokemiska tester som används för identifiering av *C. difficile*. De saknar dock den för *C. difficile* karaktäristiska lukten. *Clostridium hiranonis* och *A. stercoricanis* växte dessutom inte på *C. difficile* selektivagar i denna studie.

Problemet med ”falska positiva” isolat vid L- proline aminopeptidastest, i samband med identifiering av *C. difficile*, har beskrivits tidigare. Enligt Fedorko & Williams (1997) uppvisade alla (97/97) undersökta stammar av *C. difficile* (både toxinpositiva och toxinnegativa) positiv reaktion i L- prolin aminopeptidastest. Dessa författare rapporterade dock att man även funnit fyra andra klostridiearter (*Clostridium bifermentans*, *C. glycolicum*, *C. sordelli* och *C. sporogenes*) som också reagerade positivt i testet. Till detta kan även tilläggas att Kitahara *et al.* (2001) anger att ytterligare tre klostridiearter (*C. hiranonis*, *C. irregulare* och *C. mangenootii*) kan producera enzymet L- prolin aminopeptidas.

Fedorko & Williams (1997) har konkluderat att L- prolin aminopeptidas är en känslig och specifik konfirmeringsmetod för *C. difficile* identifiering, under förutsättning att man använder selektiva media.

Metronidazol är ett av de antibiotika som finns tillgängliga för att behandla CDI. Metronidazolresistens är endast rapporterad i ett fåtal publicerade artiklar (Peláez *et al.* 2008). I en svensk artikel där 606 toxigena kliniska isolat (humana) samlades in under perioden 1993- 2007 var samtliga känsliga för metronidazol (Norén *et al.* 2010). *C. difficile* isolat (nr 35) i den här studien uppvisade en initial resistens (64 mg/L) mot metronidazol. Vid omtestningar (efter frysningar och uppodlingar av isolatet) avtog resistensen (s.k. heteroresistens) sedan gradvis ner till en nivå på 2 mg/l. Enligt Smittskyddsinstitutet är isolatet att betrakta som resistent, eftersom brytpunkten ligger vid 1 mg/l.

Heteroresistens hos *C. difficile* har beskrivits tidigare (Peláez *et al.* 2008) och det råder stor osäkerhet kring bakomliggande mekanismer. Metronidazolresistens hos *C. difficile* från hundar har inte tidigare rapporterats. Marks & Kather (2003) studerade antibiotikaresistens hos *C. difficile* som isolerats från hundar med och utan diarré. Samtliga isolat var känsliga för metronidazol. Inom veterinärmedicinen är metronidazol ett antibiotikum med utbredd användning för hundar. Metronidazolresistens hos *C. difficile* isolat kan därför ha klinisk betydelse. Den hund som bakterien isolerades ifrån hade behandlats med Flagyl® (ett metronidazolpreparat) en månad innan provtagningen. Orsaken till behandlingen var att hunden led av gingivit.

Antibiotikaresistensbestämning av *C. hiranonis* har inte rapporterats tidigare. De två undersökta *C. hiranonis* isolaten från denna studie uppvisade resistens för erytromycin. Bakteriens roll inom humanmedicin och veterinärmedicin är ännu så länge oklar.

Syftet med föreliggande arbete var att studera förekomst av *C. difficile* i faeces från svenska hundar samt karaktärisering av isolat avseende toxinproduktion och antibiotikaresistensmönster. Resultat från detta arbete visar låg förekomst av icke toxinproducerande *C. difficile* hos friska hundar. I det fortsatta projektarbetet studeras förekomsten av *C. difficile* hos hundar med gastrointestinala symptom, både antibiotikabehandlade och icke behandlade. Målet är att klargöra om *C. difficile* kan vara sjukdomsframkallande hos hund samt utgöra reservoar för spridning av bakterien både till djur och människor.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Al Saif, N., Brazier, J.S. (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of medical microbiology* 45(2), 133-137
- Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmée, M., Brazier, J., Kuijper, E., Poxton, I. (2007). European study group on *Clostridium difficile* ESGCD (2007). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical Microbiology and Infection* 13(11), 1048-1057
- Barbut, F. & Petit, J.-C. (2001). Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 7, 405-410.
- Bartlett, J.G., Onderdonk, A.B., Cisneros, R.L. (1977a). Clindamycin-associated colitis in hamsters: protection with vancomycin. *Gastroenterology* 73, 772-776
- Bartlett, J.G., Onderdonk, A.B., Cisneros, R.L., Kasper, D.L. (1977b). Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *Journal of infectious diseases* vol. 136, no.5, 701-705
- Bartlett, J.G. (2009). *Clostridium difficile* infection: Historic review. *Anaerobe* 15, 227-229
- Bartlett, J.G. (2010). Detection of *Clostridium difficile* infection. *Infection control and hospital epidemiology* 31, suppl. 1: S35-37
- Borriello, S.P. (1979). *Clostridium difficile* and its toxin in the gastrointestinal tract in health and disease. *Research and Clinical Forums* 1, 33-35
- Borriello, S.P., Honour, P., Turner, T., Barclay, F. (1983). Household pets a potential reservoir for *Clostridium difficile* infection. *Journal of clinical pathology* 36(1), 84-87
- Borriello, S.P., Welch, A.R., Barclay, F.E., Davies, H.A. (1988). Mucosal association by *Clostridium difficile* in the hamster gastrointestinal tract. *Journal of medical microbiology* 25(3), 191-196
- Borriello, S.P. (1998). Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41, Suppl. C, 13-19
- Burns, D.A., Heap, J.T., Minton, N.P. (2010). *Clostridium difficile* spore germination: an update. *Research in microbiology* 2010, sep 21, [Epub. ahead of print]
- Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A., Gunnarsson, A. (1997). *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Veterinary Journal* 29, 279-284
- Båverud, V., Franklin, A., Gunnarson, A., Gustafsson, A., Hellander-Hedman, A. (1998). *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine veterinary journal* 30(6), 482-488
- Brazier, J.S., Hooker, J. (1989). Cross reactivity of *Clostridium glycolicum* with the latex particle slide agglutination reagent for *Clostridium difficile* identification. *Letters of applied microbiology* 8(6), 199-202
- Cave, N.J., Marks, S.L., Kass, P.H., Melli, A.C., Brophy, M.A. (2002). Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *Journal of the American veterinary medical association* 221(1), 52-59
- Chang, T.W., Bartlett, J.G., Gorbach, S.L., Onderdonk, A.B. (1978). Clindamycin-induced enterocolitis in hamsters as a model of pseudomembranous colitis in patients. *Infection and Immunity* 20(2), 526-529

- Chang, T.W., Lauermann, M., Bartlett, J.G. (1979). Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. *The Journal of infectious diseases* 145(5), 765-770
- Chang, T.W., Bartlett, J.G., Taylor, N.S. (1981). *Clostridium difficile* toxin. *Pharmacology & Therapeutics* 13(3), 441-452
- Clooten, J., Kruth, S., Arroyo, L., Weese, J.S. (2008). Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit. *Veterinary microbiology* 129(1-2), 209-214
- Davies, H.A., Borriello, S.P. (1990). Detection of capsule in strains of *Clostridium difficile* of varying virulence and toxigenicity. *Microbial pathogenesis* 9(2), 141-146
- Delmée, M., Avisani, V., Delferriere, N., Burtonboy, G. (1990). Characterization of flagella of *Clostridium difficile* and their role in serogrouping reactions. *Journal of clinical microbiology* 28(10), 2210-2214
- Donta, S.T., Sullivan, N., Wilkins, T.D. (1982). Differential effects of *Clostridium difficile* toxins on tissue-cultured cells. *Journal of clinical microbiology* 15(6), 1157-1158
- DuPont, H.L., Garey, K.W. (2010). *Clostridium difficile* infection: an emerging epidemic with more questions than answers. *Future Microbiology* 5(8), 1153-1156
- Fedorko, D.P., Williams, E.C. (1997). Use of Cycloserine-Cefoxitin-Fructose Agar and L-Proline-Aminopeptidase (PRO Discs) in the Rapid identification of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*, May 1997, 1258-1259
- Gerding, D.N. (2004). Clindamycin, Cephalosporins, Fluoroquinolones and *Clostridium difficile* associated diarrhea: This is an antimicrobial resistance problem. *Clinical Infectious Diseases* 38, 646-648
- Goorhuis, A., Debast, S.B., van Leengoed, L.A., Harmanus, C., Notermans, D.W., Bergwerff, A.A., Kuijper, E.J. (2008). *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *Journal of clinical microbiology* 46(3), 1157-1158
- Gould, L.H., Limbago, B. (2010). *Clostridium difficile* in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen? *Clinical Infectious Diseases* 51(5), 577-582
- Greetham, H.L., Gibson, G.R., Giffard, C., Hippe, H., Merkhoffer, B., Steiner, U., Falsen, E., Collins, M.D. (2004). *Allobaculum stercoricanis* gen. nov., sp. nov., isolated from canine feces. *Anaerobe* 10(5), 301-307
- Hafiz, S. (1974). *Clostridium difficile* and its toxins. Thesis submitted for the degree of doctor of philosophy of the university of Leeds.
- Hall, I.C., O'Toole, E. (1935). Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *American Journal of Disease of Children* 49, 390-402
- Hambre, D.M., Rake, G., McKee, C.M., MacPhillamy, H.B. (1943). The toxicity of penicillin as prepared for clinical use. *American Journal of Medical Science* 206, 642
- Hammitt, M.C., Bueschel, D.M., Keel, M.K., Glock, R.D., Cuneo, P., De Young, D.W., Reggiardo, C., Trinh, H.T., Songer, J.G. (2008). A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Veterinary microbiology* 127(3-4), 343-352
- Heejeung, K., Seok, H.J., Kyoung, H.R., Seong, G.H., Jong, W.K., yung-Geun, S., Mi-Na, K., Hee Bong, S., Young, U., Hyukmin, L., Kyungwon, L. (2010). Investigation of Toxin Gene Diversity, Molecular Epidemiology, and Antimicrobial Resistance of *Clostridium difficile* Isolated from 12 Hospitals in South Korea. *Korean journal of laboratory medicine* 30, 491-497

- Hensgens, M.P., Goorhuis, A., Notermans, D.W., van Benthem, B.H., Kuijper, E.J. (2010). Changing epidemiology of infections in the Netherlands in 2008/09. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 154: A 1317
- Indra, A., Lassnig, H., Baliko, N., Much, P., Fiedler, A., Huhulescu, S., Allerggerger, F. (2009). *Clostridium difficile*: a new zoonotic agent? *Wiener klinische wochenschrift* 121(3-4), 91-95
- Jangi, S., Lamont, J.T. (2010). Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 51(1), 2-7
- Jiang, W., Abrar, S., Romagnoli, M., Carroll, K.C. (2009). *Clostridium glycolicum* wound infections: Case reports and review of the literature. *Journal of clinical microbiology* 47(5), 1599-1601
- Jöbstl, M., Heuberger, S., Indra, A., Nepf, R., Wagner, M. (2010). *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *International journal of food microbiology* 138(1-2), 172-175
- Karlsson, F. (2009). Finns *Clostridium difficile* i köttprodukter i Sverige? Examensarbete vid veterinärprogrammet SLU 2009:20, ISSN 1652-8697
- Keel, K., Brazier, J.S., Post, K.W., Weese, S., Songer, J.G. (2007). Prevalence of PCR Ribotypes among *Clostridium difficile* Isolates from Pigs, Calves and Other Species. *Journal of Clinical Microbiology*, June 2007, p. 1963-1964
- Kitahara, M., Takamine, F., Imamura, T., Benno, Y. (2001). *Clostridium hiranonis* sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 alpha-dehydroxylating activity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 39-44
- Kitahara, M., Sakata, S., Sakamoto, M., Benno, Y. (2004). Comparison among fecal secondary bile acid levels, fecal microbiota and *Clostridium scindens* cell numbers in japanese. *Microbiology and Immunology* 48(5), 367-375
- Krishna, M.M., Powell, N.B., Borriello, S.P. (1996). Cell surface properties of *Clostridium difficile*: haemagglutination, relative hydrophobicity and charge. *Journal of medical microbiology* 44(2), 115-123
- Kuehne, S.A., Cartman, S.T., Heap, J.T., Kelly, M.L., Cockayne, A., Minton, N.P. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 2010, Sep 15. [Epub ahead of print]
- Kuijper, E.J., de Weerd, J., Kato, H., Kato, N., van Dam, A.P., van der Vorm, E.R., Weel, J., van Rhee, C., Dankert, J. (2001). Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20(8), 528-534
- Lyerly, D.M., Saum, K.E., Macdonald, D.K., Wilkins, T.D. (1985). Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infection and Immunity*, 47(2), p. 349-352
- MacFarland, L.V., Beneda, H.W., Clarridge, J.E., Raugi, G.J. (2007). Implications of the changing face of *Clostridium difficile* disease for health care practitioners. *American Journal of Infection Control* 35(4), 237-253
- Marks, S.L., Kather, E.J. (2003). Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Veterinary microbiology* 94, 39-45

- Mentula, S., Harmoinen, J., Heikkilä, M., Westermarck, M., Rautio, M., Huovinen, P., Könönen, E. (2005). Comparison between cultured small- intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *Applied and environmental microbiology* 71(8), 4169-4175
- Norén, T., Alriksson, I., Åkerlund, T., Burman, L.G., Unemo, M. (2010). *In vitro* susceptibility to 17 antimicrobials of clinical *Clostridium difficile* isolates collected in 1993-2007 in Sweden. *Clinical microbiology and infection* 16(8), 1104-1110
- Planche, T., Aghaizu, A., Holliman, R., Riley, P., Poloniecki, J., Breathnach, A., Krishna, S. (2008). Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *The lancet infectious diseases* 8(12), 777-784
- Peláez, T., Cercenado, E., Alcalá, L., Marin, M., Martín- López, A., Martínez- Alarcón, J., Catalán, P., Sánchez- Somolinos, M., Bouza, E. (2008). Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *Journal of clinical microbiology* 46(9), 3028-3032
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. (first ed., 2002). Kapitel: 7,16. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell science Ltd.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (10:th ed., 2007) Kapitel: 17. *Veterinary Medicine*. Elsevier Ltd.
- Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H.R., Duffield, T., Peregrine, A.S., Trotz-Williams, L.A., Arroyo, L.G., Brazier, J.S., Weese, J.S. (2006). *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging infectious diseases* 12(11), 1730-1736
- Roberts, K., Smith, C.F., Snelling, A.M., Kerr, K.G., Banfield, K.R., Sleight, P.A., Beggs, C.B. (2008). Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BMC Infectious diseases* 8:7, doi:10.1186/1471-2334-8-7
- Rupnik, M. (2010). *Clostridium difficile*: (Re)emergence of Zoonotic Potential. *Clinical Infectious Diseases* 51(5), 583-584
- Seddon, S.V., Hemingway, I., Borriello, S.P. (1990). Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster model. *Journal of medical microbiology* 31(3), 169-174
- Simango, S. (2006). Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100(12), 1146-1150
- Smith, L.D., King, E.O. (1962). Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. *Journal of bacteriology* 82, 65-67
- Smittskyddsinstitutet. (2010a). EPI-aktuellt, vol9, nr 39.[online] tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/publikationer/smis-nyhetsbrev/epi-aktuellt/epi-aktuellt-2010/epi-aktuellt-vol-9-nr-39-30-september-2010/> [2010-09-30]
- Smittskyddsinstitutet. (2010b). Tema vårdrelaterade smittor. Slutrapport 2010-06-17. [online] tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/upload/Publikationer/slutrapport-tema-vardrelaterade-smittor-2009-2010.pdf> [2010-06-17]
- Songer, J.G., Post, K.W., Larsson, D.J., Jost, H.B., Glock, R.D. (2000). Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine health and production* 8(4), 185-189
- Songer, J.G., Andersson, M.A. (2006). *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12(1), 1-4

- Sorg, J.A., Sonenshein, A.L. (2008) Bile salts and glycine as cogerminants of *Clostridium difficile* spores. *Journal of bacteriology* 190(7), 2505-2512
- Sorg, J.A., Sonenshein, A.L. (2009) Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *Journal of bacteriology* 191(3), 1115-1117
- Struble, A.L., Tang, Y.J., Kass, P.H., Gumerlock, P.H., Madewell, B.R., Silva, J.Jr. (1994). Fecal shedding of *Clostridium difficile* in dogs: a period prevalence survey in a veterinary medical teaching hospital. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 6(3), 342-347
- Suchodolski, J.S., Xenoulis, J.S., Steiner, J.M. (2006). Prevalence of *Clostridium hiranonis* in the intestinal tract of healthy dogs and dogs with gastrointestinal disease. Oral research communications of the 16th ECVIM-CA congress, Amsterdam, Holland, 14th-16th september 2006
- Taha, S., Johansson, O., Rivera Jonsson, S.R., Heimer, D., Krovacek, K. (2007). Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 30(3), 163-174
- Tasteyre, A., Barc, M.C., Collignon, A., Boureau, H., Karjalainen, T. (2001). Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infection and Immunity* 69(12), 7937-7940
- Taylor, N.S., Bartlett, J.G. (1979) Partial purification and characterization of a cytotoxin from *Clostridium difficile*. *Reviews of infectious diseases* 1(2), 379-385
- Taylor, N.S., Thorne, G.M., Bartlett, J.G. (1981). Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*. *Infection and Immunity* 34(3), 1036-1043
- Tedesco, F.J., Barton, R.W., Alpers, D.H. (1974). Clindamycin-associated colitis: a prospective study. *Ann. Intern. Med.* 81, 429-433
- Todar, K. (2010). Online Textbook of Bacteriology. [online] tillgänglig: [www.textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/pathogenesis.html](http://www.textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/pathogenesis.html)
- Van Nood, E., Speelman, P., Kuijper, E.J., Keller, J.J. (2009). Struggling with recurrent *Clostridium difficile* infections: Is donor faeces the solution? *Eurosurveillance* 14(34), articleID:19316
- Vetbakt. Veterinärmedicinsk bakteriologi: information om betydelsefulla arter, SLU & SVA, Uppsala, Sverige. [online] tillgänglig: [www.vetbact.org](http://www.vetbact.org)
- Von Abercron, S.M., Karlsson, F., Wigh, G.T., Wierup, M., Krovacek, K. (2009). Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in Sweden. *Journal of food protection* 72(8), 1732-1734
- Voth, D.E., Ballard, J.D. (2005). *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 247-263
- Weese, J.S., Staempli, H.R., Prescott, J.F. (2000). Isolation of environmental *Clostridium difficile* from a veterinary teaching hospital. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 12(5), 449-452
- Weese, J.S., Finley, R., Reid-Smith, R.R., Janecko, N., Rousseau, J. (2010). Evaluation of *Clostridium difficile* in dogs and the household environment. *Epidemiology and infection* 138(8), 1100-1104
- Wells, J.E., Williams, K.B., Whitehead, T.R., Heuman, D.M., Hylemon, P.B. (2003). Development and application of a polymerase chain reaction assay for the detection and enumeration of bile acid 7 $\alpha$ -dehydroxylating bacteria in human feces. *International journal of clinical chemistry* 331(1-2), 127-134

- Wilson, K.H., Kennedy, M.J., Fekety, F.R. (1982). Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. Journal of clinical microbiology 15(3), 443-446
- Wolfhagen, M., J, Meijer, K., Fluit, A.C., Torensma, R., Bruinsma, R.A., Fler, A., Verhoef, J. (1994). Clinical significance of *Clostridium difficile* and its toxins in faeces of immunocompromised children. Gut 35(11), 1608-1612
- Yoo, J., Lightner, A.L. (2010). *Clostridium difficile* infections: What every clinician should know. The Permanente Journal 14(2), 35-40
- Zerbini, L., Ossiprandi, M.C. (2007). Prevalence of *Clostridium* spp. in diarrhoeic and healthy dogs. Ann. Fac. Medic. Vet. Di Parma (Vol XXVII, 2007) p. 143-156